

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 074 628 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(45 6,977, 4.58

(43) Veröffentlichungstag:
07.02.2001 Patentblatt 2001/06

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/61, C12N 15/80,
C12N 1/21, C12N 9/90,
C12Q 1/68, C12P 41/00
// (C12P41/00, C12R1:01)

(21) Anmeldenummer: 00115902.9

(22) Anmeldetag: 25.07.2000

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 27.07.1999 DE 19935268

(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60287 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• Verseck, Stefan, Dr.
52074 Aachen (DE)
• Kula, Maria-Regina
52382 Niederzier (DE)
• Bommarius, Andreas, Dr.
60596 Frankfurt am Main (DE)
• Drauz, Karlheinz, Prof.
63579 Freigericht (DE)

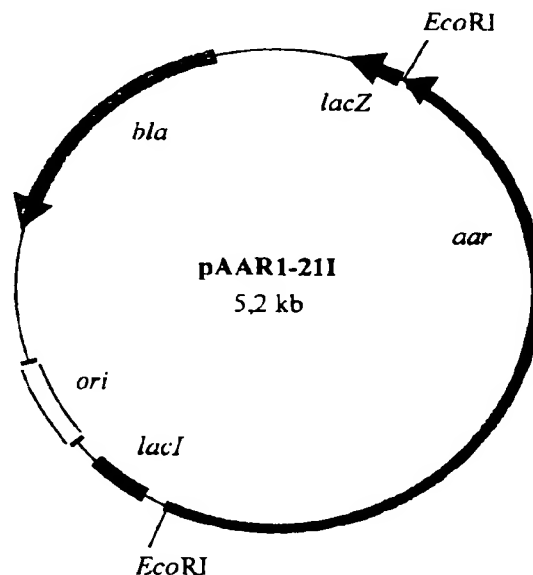
(54) N-Acetylaminosäureracemase

(57) Die vorliegende Erfindung richtet sich auf eine N-Acetylaminosäureracemase (AAR) sowie das diese codierende Gen. Außerdem werden die dieses Gen enthaltenden Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen geschützt.

Die AAR des Standes der Technik hat eine hoch schwermetallionenabhängige Aktivität. Dieses Merkmal ist bei der vorliegenden AAR vermindert.

Verwendung der AAR zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren und Derivaten davon.

Fig. 1:



EP 1 074 628 A1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung richtet sich auf eine N-Acetylaminosäureracemase (AAR) aus *Amycolatopsis orientalis subspecies lurida* sowie das dafür codierende Gen und das Gen enthaltende Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen.

[0002] Mittels N-Acetylaminosäureracemasen können im Zusammenwirken mit Acylasen optisch reine Aminosäuren zu 100 % aus den entsprechenden geschützten racemischen N-Acetylaminosäuren gewonnen werden. Optisch reine Aminosäuren werden in der parenteralen Ernährung sowie zur Herstellung chiraler bioaktiver Wirkstoffe gebraucht.

[0003] Aus *Streptomyces atratus* Y-53 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994, 40, 835-840) und *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a, 42, 853-859) sind bereits N-Acetylaminosäureracemasen (AAR) bekannt.

[0004] Die AAR aus *Amycolatopsis* sp. TS-1-60 besitzt bzgl. ihrer Aktivität eine starke Kobalt- und Manganionen-abhängigkeit. Die Zugabe dieser Schwermetallionen zur Synthesebrühe ist im großtechnischen Maßstab aus Sicht des Umweltschutzes nachteilig.

[0005] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, eine weitere AAR zur Verfügung zu stellen, welche darüber hinaus eine geringere Aktivitätsabhängigkeit von Schwermetallionen aufweist, verglichen mit der AAR aus TS-1-60.

[0006] Gelöst wird diese Aufgabe durch eine AAR gemäß Anspruch 1. Anspruch 2 schützt die für dieses Enzym codierenden Gene. Anspruch 3 bis 5 betrifft Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen, die diese Gene enthalten. Anspruch 6 ist auf Primer für dieses Gen gerichtet. Anspruch 7 schützt vorteilhafte Gensonden zum Aufspüren des AAR-Gens. Ansprüche 8 und 9 sind auf vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen AAR gerichtet.

[0007] Dadurch, daß man die N-Acetylaminosäureracemase (Seq. 2) aus *Amycolatopsis orientalis subspecies lurida* zur Racemisierung von N-Acetylaminosäuren bereitstellt, erhält man ein Enzym, welches ausschließlich N-Acetylaminosäuren racemisiert, N-ungeschützte Aminosäuren nicht umsetzt und darüber hinaus gegenüber der AAR aus TS-1-60 eine geringere Abhängigkeit für das Schwermetallion Co^{2+} aufweist. Diese Tatsache ist für den großtechnischen Einsatz des Enzyms allerdings aus Kosten- und Umweltgesichtspunkten äußerst vorteilhaft. Die Identität auf DNA-Ebene von A. sp. TS-1-60 (Tokuyama et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995b, 42, 884-889) und A. *orientalis* subsp. *lurida* bzgl. des Gens, welches für die Racemase codiert, beträgt 86 %. Es war mithin sehr überraschend, in einer Gattung von Mikroorganismen gleiche Enzyme mit derart verschiedenen Eigenschaften zu finden.

[0008] In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung werden Gene (Seq. 1) codierend für die erfindungsgemäße Racemase beansprucht. Hierbei sind erfindungsgemäß auch die Gene umfaßt, welche im Rahmen der Bandbreite, die durch die Degeneration des genetischen Codes vorgegeben wird, möglich erscheinen.

[0009] Weiterhin sind im Rahmen der Erfindung auch Plasmide oder Vektoren geschützt, welche die erfindungsgemäßen Gene aufweisen. Als bevorzugte Plasmide und Vektoren sind anzusehen pAAR1-211, pAAR2-211 und pAAR3-211 (Fig. 1, 3 u. 4).

[0010] In einer weiteren Ausgestaltung der Erfindung sind alle Mikroorganismen, die die erfindungsgemäßen Gene aufweisen, beansprucht. Insbesondere sind dies Mikroorganismen wie die Plasmid tragenden E. coli-Stämme (DH5 α bzw. BL21). Ganz besonders bevorzugt ist der Stamm DE3 in diesem Zusammenhang.

[0011] Prinzipiell kommt für die Durchführung der Erfindung jedes dem Fachmann bekannte Plasmid (Vector)/Wirts-System in Frage, in welches das Gen über eine entsprechende Schnittstelle kloniert bzw. das so entstandene Konstrukt transformiert werden kann. Dem Fachmann sind derartige Systeme geläufig, und er weiß um die Möglichkeit, daß Plasmide mit verschiedenen Wirts-Systemen kombiniert werden können. Eine Übersicht über das T7-Expressionssystem ist in Studier et al., Methods Enzymol. 1990, 185, 61-69 gegeben. Weitere geeignete Expressionssysteme können in den einschlägig bekannten Prospekten der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech sowie Gibco BRL gefunden werden.

[0012] Das Ableiten geeigneter Primer geschieht durch den Vergleich von schon bekannten DNA-Sequenzen des gesuchten Gens, oder durch das "Übersetzen" von Aminosäure-Sequenzen in die Kodon-Verwendung des entsprechenden Organismus (zum Beispiel für Streptomycceten: Wright et al., Gene 1992, 113, 55-65). Auch übereinstimmende AS-Sequenzen von Proteinen aus sogenannten Superfamilien sind dabei hilfreich (Firestine et al., Chemistry & Biology 1996, 3, 779-783).

[0013] Die hier erwähnte AAR gehört dabei der Enolase-Superfamilie an (Babbitt et al., Biochemistry 1996, 35, 16589-16501). Es sind dem Fachmann deshalb bevorzugt Strategien bekannt, die zu Primern führen, welche für den erfindungsgemäßen Zweck als vorteilhaft erscheinende Sequenz herangezogen werden können. Insbesondere können für die erfolgreiche PCR-vermittelte Amplifikation eines Genabschnitts zwei Primer (AR1) und (AR5) konstruiert werden.

AR1: 5' ATG AAA CTG AGC GGC GTG GAA CTG CGG CGA 3' (Seq. 4)

AR5: 5' CCA GCC GGG TTC GAT CTT GAG CTT GAT GCG 3' (Seq. 5)

[0014] Weiterhin sind als bevorzugte Primer die schnittstellenträgenden Anfangs- bzw. Endsequenzen des erfindungsgemäßen Gens anzusehen. Geeignete Schnittstellen sind in den oben angesprochenen Prospekten zu finden.

[0015] Ganz besonders bevorzugt sind die folgenden Sequenzen, welche die NdeI bzw. BglII-Schnittstelle aufweisen:

AR_EX1Nde: 5'CAA GGA GCA CAT ATG AAA CTC AGC GGT GTG G3' (Seq. 6)

AR_Ex2Bgl: 5'GAA TTC GTA AGA TCT TAC GAA CCG ATC CAC G3' (Seq. 7)

[0016] Mit den zwei Primern AR1 und AR5 wurde ein 504 bp großes Fragment des erfindungsgemäßen Gens mittels PCR-Technik amplifiziert. Diese Technik ist ausführlich in Saiki et al., Science (1988), 239, 487-491 gewürdigt und dem Fachmann daher bekannt. Seine Abfolge an Basenpaaren (Seq. 3) ist wie unten dargestellt:

```

5  `ATGAAACTGAGCGGCGTGGAAGTGC`GCGAGTCCGGATGCCGCTCGTGGCCCCGTTC
20 CGGACGTCGTTCTGGGACGCAGTCCGAGCGGGAATTGCTGCTGGTCCGCGCGGTGACCCC
   GCGCGGCGAGGGCTGGGGCGAATGTGTGCGGATGGAGGCGCCGCTCTACTCGTCGGAGT
   ACAACGACGCCCGCGAGCACGTGCTGCGGAACCATCTGATCCCCGCACTGCTGGCGGCC
25 GAGGACGTGACCGCGCACAAAGGTGACGCCGTTGCTGGCGAAGTTCAAGGGCCACCGGAT
   GGCGAAGGGCGCGCTGGAGATGGCGGTCCTCGACGCCGAAGTCCGCGCGCATGACCGGT
   CCTTCGCGGCCGAGCTGGGGTCCACTCGCGACTCCGTGGCCTGCGGGGTCTCGGTCTGGG
30 ATCATGGACTCGATCCCGCACCTGCTCGACGTCGTGCGCGGCTACCTCGACGAGGGCTA
   CGTCCGCATCAAGCTCAAGATCGAACCCGGCTGG3  `

```

[0017] Es diene als Teil einer Sonde zum Auffinden des beanspruchten Gens. Die Herstellung einer Gensonde aus einem Genfragment ist u. a. in Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) dargestellt und dem Fachmann geläufig. In diesem speziellen Fall wurde das o. a. Genfragment zusammen mit der DIG-Markierung der Firma Roche Diagnostics verwendet.

[0018] Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ebenfalls die Verwendung der erfindungsgemäßen Racemase in einem Prozeß zur Herstellung von optisch angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten. Dazu wird die racemische N-Acetylaminosäure in Gegenwart einer Acylase und der AAR unter physiologischen Bedingungen zur Reaktion gebracht. Dadurch, daß die gebildete Aminosäure dabei durch Ausfällung aus dem Gleichgewicht der Reaktion entfernt wird und die AAR aus der verbleibenden optisch angereicherten N-Acetylaminosäure immer das Racemat bildet, kommt es zur 100%igen Umsetzung des Racemats zu einer optischen Antipode der betreffenden Aminosäure.

[0019] Vorzugsweise erfolgt dieser Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor (DE 199 10 691.6).

[0020] Mit Hilfe der oben dargestellten Sonde wurde über Southern-Hybridisierung (Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985)) ein ca. 2,5 kb EcoRI Fragment aus genomischer DNA von *A. orientalis* subspecies *lurida* detektiert.

[0021] Es folgte eine Shot-gun Klonierung, in der die gesamte DNA-Population von 2,5 kb großen EcoRI Fragmenten der genomischen DNA in die zuvor mit dem Restriktionsenzym EcoRI hydrolysierten Plasmide pUC18 (Vieira et al., Gene (1982), 19, 259-268) ligiert wurden.

[0022] Die so entstandenen Vektoren wurden dann in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Identifikation des DNA-Fragmentes mit dem Gen der AAR erfolgte dann mittels Kolonie-Hybridisierung (Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985)) unter Verwendung der zuvor beschriebenen DIG-markierten 504 bp-Sonde.

[0023] Das erhaltene Plasmid mit dem AAR-Gen wurde pAAR1-211 (Fig. 1) genannt. Fig. 2 zeigt die Restriktionskarte des 2,5 kb EcoRI Fragmentes mit dem AAR-Gen. Das 1,3 kb-EcoRI Fragment mit dem AAR-Gen wurde doppelsträngig sequenziert und analysiert.

[0024] Für die Amplifikation des Gesamtgens mittels PCR aus pAAR1-211 wurden die Primer AR_Ex1Nde und AR_Ex2Bgl eingesetzt. Mit Hilfe dieser Primer wurde am 5'-Ende des Gens eine NdeI-Restriktionsschnittstelle eingefügt und am 3'-Ende des AAR-Gens eine BglII-Schnittstelle.

[0025] Das Amplifikat wurde blunt-end in mit Smal hydrolysiertem Plasmid pUC18 ligiert und das so entstandene Konstrukt pAAR2-211 (Fig. 3) in *E. coli* DH5 α transformiert.

[0026] Das Einfügen dieser Restriktionsschnittstellen NdeI und BglII ermöglichte die Klonierung des Gens in den Expressionsvektor pET11a (Firma Novagen). Dieser Expressionsvektor, pAAR3-211 (Fig. 4) genannt, mit dem AAR-Gen aus *A. orientalis* subspecies *lurida* wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) (Firma Novagen; enthält T7-Polymerase unter der Kontrolle des lac-Operons im Genom integriert) transformiert.

[0027] Mittels des Expressionsplasmides pAAR3-211 konnte die AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3) nach einem abgewandeltem Protokoll von Studier et al., *Methods Enzymol* (1990), 185, 61-89 heterolog überexprimiert werden. Die Überexpression wurde durch Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert. Der *E. coli* Expressionsstamm besaß ursprünglich keine N-Acetylaminosäureracemase-Aktivität.

[0028] Die AAR-Aktivität wurde in einem gekoppeltem enzymatischen Assay (Abb. 1) verfolgt, indem die Bildung einer deacetylierten Aminosäure aus einer N-Acetyl-D-Aminosäure, hier Methionin, mit dem HPLC-System I nachgewiesen wurde. Als Hilfsenzyme dienten die L-spezifischen Acylasen aus Schweinenieren oder *Aspergillus oryzae*.

N-Acetyl-D-Methionin

N-Acyl-Aminosäure-
Racemase (AAR)

N-Acetyl-L-Methionin

Acylase

L-Methionin

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Enzymassays.

[0029] Die Aufreinigung der heterolog überexprimierten AAR erfolgte nach Zellaufschluß über 3 Schritte:

1. Hitzefällung bei 50°C für 30 min.
2. Anionen-Austauschchromatographie über Q-Sepharose (fast flow; Firma Pharmacia)
3. Hydrophobe-Interaktionschromatographie über Phenyl-Sepharose (stream line; Firma Pharmacia)

[0030] Weitere Charakterisierungen der AAR erfolgten mit dem HPLC-System II. Mit diesem Systems konnte die Aktivität der AAR direkt untersucht werden. Auf das Hilfsenzym, die Acylase, konnte so verzichtet werden, so daß störende Nebenaktivitäten vermieden werden konnten.

[0031] Als Eigenschaften der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* haben sich folgende herauskristallisiert:

- i) Die AAR racemisiert ausschließlich N-Acetylaminosäuren, N-Acetyl-ungeschützte Aminosäuren werden nicht umgesetzt.
- ii) Die überexprimierte Proteinbande der AAR erscheint in der SDS-PAGE-Analyse (Laemmli, *Nature* (1970), 227, 680-685), im denaturierten Zustand, bei einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa.
- iii) Die AAR besitzt ein pH-Optimum bei pH 8 (Fig. 5).

iv) Die spezifische AAR-Aktivität nach Aufreinigung betrug 30,6 U/mg mit 2 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay. Dieser Wert liegt damit ca. 30,8 % höher als der bei Tokuyama und Hatano (Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44, 774-777) für deren Racemase gefundene.

v) Die Aktivität mit 10 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay betrug 37,5 U/mg.

vi) Die Steigerung der Aktivität der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* mit 1 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ gegenüber der Aktivität ohne Metallion im Assay betrug 1250 %. Die Gabe von 1 mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ im Assay bewirkte bei der AAR aus *A. sp.* TS-1-60 eine Steigerung von nur 496 % (Tokuyama und Hatano, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, 44, 774-777). Daraus ergibt sich, daß die AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* bei gleicher $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Konzentration im Assay um 152 % aktiver ist, als die Racemase aus *A. sp.* TS-1-60.

vii) Weitere zweiwertige Ionen, wie $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ wurden in verschiedenen Konzentrationen im Standardenzymassay getestet. Dabei zeigten Mn und Mg noch ca. 40 % der Aktivität, bei 10 mM, im Vergleich zur Kobaltsubstitution (Fig. 6).

viii) Eine Substrat-Inhibierung tritt bei der AAR aus *A. orientalis* subspecies *lurida* bei Substratkonzentrationen von N-Acetyl-D-methionin größer 200 mM auf (Fig. 7). Für die TS-1-60 wurde eine Inhibierung schon bei 50 mM N-Acetyl-D-methionin beobachtet.

[0032] Es läßt sich festhalten, daß die vorliegende Racemase gegenüber der aus dem Stand der Technik genannten deutliche Vorteile im Hinblick auf Aktivität, Schwermetallionenabhängigkeit und Inhibierungstendenz für den Einsatz im industriellen Maßstab bereithält.

[0033] Der Mikroorganismus *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* ist unter der Nummer DSM43134 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt.

[0034] Unter AAR wird im Rahmen der Erfindung sowohl das native wie auch das rekombinant hergestellte Enzym verstanden.

Beispiele:

1. Anzucht des Actinomyceten-Stamms *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* und Präparation der genomischen DNA

[0035] Der Actinomyceten-Stamm *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* (DSM43134) wuchs auf TSB-Medium (Oxoid, Wesel) an. Die Kultur wurde nach der Ernte zweimal mit steriler 10,3%iger Saccharoselösung gewaschen und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Die Präparation der genomischen DNA erfolgte nach MEHLING et al., FEMS Microbiol Lett (1995), 128, 119-126.

2. Oligonucleotide

[0036]

Tabelle 1

Liste der verwendeten Oligonucleotide.		
Bezeichnung:	Verwendung:	Sequenz:
AR1	PCR	5' (AG)TG AA(AG) CT(GC) AG(GC) GG(GCT) GT(GC) GA(AG) CT(GC) CG(GC) CGA 3'
AR5	PCR	5' CCA (GC)CC (GC)GG (GCT)TC GAT CTT (GC)AG CTT GAT (GC)CG 3'
AR_Ex1Nde	PCR	5' CAA GGA GCA CAT ATG AAA CTC AGC GGT GTG G 3'
AR_Ex2Bgl	PCR	5' GAA TTC GTA AGA TCT TAC GAA CCG ATC CAC G 3'

3. Gentechnische Methoden

[0037] Alle hier verwendeten gentechnischen Methoden sind, wenn nicht anders vermerkt, beschrieben von Sam-

brook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985). Alle Enzyme und entsprechende Puffer wurden nach Angaben der Hersteller benutzt. Für die automatische Sequenzierung mit dem ALFred DNA-Sequencer (Pharmacia, Freiburg) wurden Cy5 markierte Primer benutzt. Der Southern-Blot und die Hybridisierung, sowie das 3'-DIG-Labeling (für nicht-radioaktiven Nachweis) der DNA-Sonden erfolgten nach Angaben der Firma Roche Diagnostics.

4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

[0038] DNA-Amplifikationen mittels der Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Biometra Thermocycler (Göttingen) in Anlehnung an Saiki et al., Science (1988), 239, 487-491 durchgeführt. Als Template diente genomische DNA aus *A. orientalis subspecies lurida*. Es wurde die thermostabilen DNA-Polymerase Taq (Firma Gibco BRL) in den PCR-Ansätzen eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 1 aufgelistet. Die Annealing-Temperatur A wurden über die DNA-Schmelztemperatur (T_m) der Oligonucleotide ermittelt. Die Zeit X für die Kettenreaktion der DNA-Polymerase richtete sich nach der 1 kb = 1 min-Regel. Alle Ansätze wurden mit ca. 50 µl Mineralöl überschichtet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes:

[0039]

Polymerase-Puffer (10 x 5 µl)

dNTP's je 10 nmol

Primer je 50 pmol

DMSO 10%

DNA-Polymerase 1 U

chromosomale DANN 10 - 100 ng

Auffüllen mit H₂O auf 50 µl

(MgCl₂ nach Angaben des Herstellers der Polymerase)

Amplifikationsprogramm:

[0040]

Schritt 1	98° C	5 min
2	95° C	1 min
3	A°C	45 sec
4	72° C	Xmin
5	72° C	2 min

[0041] Zugabe der DNA-Polymerase bei Schritt 2, die Schritte 2 - 4 wurden 30 mal durchlaufen.

Tabelle 2

Auflistung der für die PCR verwendeten Primerpaare (vgl. Tab. 1), Annealing-Temperaturen, sowie die Länge der Amplifikate.		
Primer-Paar:	Annealing-Temperatur (T_m):	Länge der zu amplifizie- renden DNA:
AR1/AR5	73,8°C	1,1 kb
AR_Ex1Nde/AR_Ex2Bgl	69,0°C	1,1 kb

5. Hybridisierung nach Southern und Koloniehybridisierung

[0042] Für die Hybridisierung nach Southern wurden Aliquots von Präparationen der genomischen DNA von *A. orientalis* subspecies *lurida* mit dem Restriktionsenzym EcoRI hydrolysiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden dann über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Die so aufgetrennten Fragmente wurden anschließend auf eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Firma Amersham) geblottet. Als Sonde wurde das DIG-markierte (Firma Roche Diagnostics) 504 bp-Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida* eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur betrug 61°C.

[0043] Das Signal gebende 2,5 kb große DNA-Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida* wurde eluiert, mit dem EcoRI hydrolysiertem Plasmid pUC18 ligiert und anschließend in *E. coli* DH5 α Shot-gun kloniert.

[0044] Die durch die Shot-gun Klonierung gewonnenen *E. coli* Transformanten wurden zu je 50 auf LB_{amp100}-Platten ausgestrichen. Mit diesen Platten wurde dann ein Colonie-Lift und anschließend eine Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Als Sonde diente wiederum das DIG-markierte 504 bp Fragment aus *A. orientalis* subspecies *lurida*. Mit dieser Methode konnte eindeutig eine *E. coli* Transformante mit dem AAR-Gen identifiziert werden. Das Plasmid wurde pAAR1-211 genannt.

[0045] Diese Techniken sind ausführlich in Sambrook et al., A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) und Hopwood et al., A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich (1985) gewürdigt und dem Fachmann daher bekannt.

6. Heterologe Expression des AAR-Enzyms aus *A. orientalis* subsp. *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3)

[0046] Die standardisierte heterologe Expression des rekombinanten AAR-Enzyms aus *A. orientalis* subsp. *lurida* in *E. coli* BL21 (DE3) erfolgte in Anlehnung an Studier et al., Methods Enzymol (1990), 185, 61-89:

[0047] Mit Plasmiden zur Überexpression (pAAR3-211) transformierte *E. coli* BL21(DE3)-Derivate wurden in LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert. Es wurden dann 500 ml Hauptkultur (LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin in 4 Schikane-Kolben) mit 10 ml Übernachtskultur (1 : 50) beimpft. Die T7-Polymerase wurde bei einer Zelldichte von OD_{600nm} = 0,5 - 0,9 mit 5 ml einer 100 mM IPTG-Lösung (Konzentration im Kolben 1 mM; IPTG = Isopropylthiogalactosid) induziert. Nach weiteren 4 - 6 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet.

[0048] In Rohextrakten der Expressionsklone, die in oben beschriebener Weise angezogen wurden, konnte eine AAR-Aktivität von 0,6 - 1,2 U/mg Gesamtprotein ermittelt werden.

7. Nachweis der Racemaseaktivität des rekombinanten AAR-Enzyms

[0049] Rohextrakte der Überexpressionsklone bzw. gereinigte Enzymfraktionen wurden in einem Enzymtest eingesetzt, indem die Bildung von L-Methionin aus N-Acetyl-D-Methionin (s. Abb. 1) über HPLC nachgewiesen werden konnte:

[0050] Der Standard-Enzymtest (abgewandelt nach Tokuyama et al., Appl Microbiol Biotechnol (1994), 40, 835-840; ibid, Appl Microbiol Biotechnol (1995a), 42, 853-859) setzte sich wie folgt zusammen:

Lösungsmittel: Tris/HCl, pH 7,5 50 mM

N-Acetyl-D-Methionin 25 mM

Cobaltchlorid 2 mM

Acylase I (ASch o. AAsp) 1 U

Protein 2 - 150 μ g aufgereinigtes Protein o. Gesamtprotein Endvolumen 200 μ l

[0051] Acylase I und Co²⁺ liegen dabei im Überschuß vor, so daß die AAR-Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Inkubation erfolgte 10-40 min bei 30°C. Die Reaktion wurde dann durch 3minütiges Kochen

gestoppt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC (System I).

[0052] Wenn nicht anders erwähnt, wurde Acylase I aus Schweinenieren (ASch) im Enzymtest eingesetzt und als Ion Co^{2+} ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$). Alternativ wurde aber auch Acylase I aus *Aspergillus oryzae* (AAsp) verwendet.

[0053] In Assays, welche über HPLC-System II analysiert wurden, konnte die Acylase weggelassen werden, da mit diesem System N-Acetylaminosäuren direkt enantioselektiv getrennt und nachgewiesen werden konnten.

[0054] Außer Co^{2+} ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) wurden auch andere zweiwertige Ionen, wie $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, zu $\text{SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (0,1-10 mM).

[0055] Die Substratinhibition wurde getestet, indem die Aktivität der AAR mit 25 bis 400 mM N-Acetyl-D-methionin als Substrat versetzt wurde.

8. HPLC-Analyse

System I:

[0056]

Säule: RP C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, Chromasil®

Laufmittel A: 23 mM Natriumacetat, 10% Acetonitril, pH 6,0

Laufmittel B: 100% Acetonitril

Flußrate: 1 ml/min

Probenvolumen: 20 μl

Detektion: UV-VIS 225 nm

Fluoreszenz: 340/440 nm

Derivatisierung: auf Basis o-Phthaldialdehyd (OPA)/N-Isobutyryl-L-Cystein (IBLC) nach Brückner et al., Journal of Chromatography A (1994), 666, 259-273.

Gradient:

[0057]

Zeit	Gemisch
0 min	0% B
20 min	24% B
22 min	100% B
23 min	100% B
25 min	0% B
35 min	0% B

System II:

[0058]

Säule: ENAN 1, Merget, 145 x 4,6 mm, (Dr. K. Günther, Degussa-Hüls AG, persönliche Leihgabe)

Laufmittel A: 700 ml Methanol, 300 ml Ammoniumacetat (0,01 M), 0,5 ml Eisessig

Flußrate: 1 ml/min

Probenvolumen: 20 μl

Detektion: UV-VIS 225 nm

Gradient: isokratisch

9. Aufreinigung der AAR aus *A. orientalis subspecies lurida*

[0059] Die Aufreinigung der heterolog überexprimierten AAR erfolgte nach Zellaufschluß über 3 Schritte:

1. Zellaufschluß: 30%ige Zellsuspension mit Tris/HCl (pH 7,5) und das 1,5fache an Glasperlen (Durchmesser 0,3 mm) wurden vermengt und im Disintegrator S (für 2 mal 15 min) aufgeschlossen.

2. Hitzefällung bei 50°C für 30 min.

3. Anionen-Austauschchromatographie über Q-Sepharose (fast flow; Firma Pharmacia), Elution bei ca. 25 % Laufmittel B.

4. Hydrophobe-Interaktionschromatographie über Phenyl-Sepharose (stream line; Firma Pharmacia), Elution bei ca. 40 % Laufmittel B.

[0060] Die Elution erfolgte jeweils mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Laufmittel A) über einen linearen Gradienten mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 (Laufmittel B).

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Huels Aktiengesellschaft

<120> N-Acetylaminosäureracemase

<130> 990095 AM

<140>

<141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1107

<212> DNA

<213> Amycolatopsis orientalis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1107)

<400> 1

gtg	aaa	ctc	agc	ggt	gtg	gaa	ctg	cgc	cgg	gtc	cgg	atg	ccg	ctc	gtg	48
Val	Lys	Leu	Ser	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Arg	Val	Arg	Met	Pro	Leu	Val	
1				5				10					15			
gcc	ccg	ttc	cgg	acg	tgc	ttc	ggg	acg	cag	tcc	gag	cgg	gaa	ttg	ctg	96
Ala	Pro	Phe	Arg	Thr	Ser	Phe	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	
			20				25						30			
ctg	gtc	cgc	gcg	gtg	acc	ccg	gcg	ggc	gag	ggc	tgg	ggc	gaa	tgt	gtc	144
Leu	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Gly	Glu	Gly	Trp	Gly	Glu	Cys	Val	
		35					40					45				
gcg	atg	gag	gcg	ccg	ctc	tac	tgc	tgc	gag	tac	aac	gac	gcc	gcc	gag	192
Ala	Met	Glu	Ala	Pro	Leu	Tyr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Asn	Asp	Ala	Ala	Glu	
	50					55					60					
cac	gtg	ctg	cgg	aac	cat	ctg	atc	ccc	gca	ctg	ctg	gcg	gcc	gag	gac	240
His	Val	Leu	Arg	Asn	His	Leu	Ile	Pro	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Asp	
	65				70				75						80	
gtg	acc	gcg	cac	aag	gtg	acg	ccg	ttg	ctg	gcg	aag	ttc	aag	ggc	cac	288
Val	Thr	Ala	His	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Leu	Ala	Lys	Phe	Lys	Gly	His	
				85				90						95		
cgg	atg	gcg	aag	ggc	gcg	ctg	gag	atg	gcg	gtc	ctc	gac	gcc	gaa	ctc	336
Arg	Met	Ala	Lys	Gly	Ala	Leu	Glu	Met	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Glu	Leu	
			100				105						110			
cgc	gcg	cat	gac	cgg	tcc	ttc	gcg	gcc	gag	ctg	ggg	tcc	act	cgc	gac	384
Arg	Ala	His	Asp	Arg	Ser	Phe	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr	Arg	Asp	
		115					120					125				
tcc	gtg	gcc	tgc	ggg	gtc	tgc	gtc	ggg	atc	atg	gac	tgc	atc	ccg	cac	432
Ser	Val	Ala	Cys	Gly	Val	Ser	Val	Gly	Ile	Met	Asp	Ser	Ile	Pro	His	

EP 1 074 628 A1

	130	135	140	
5	ctg ctc gac gtc gtc ggc ggc tac ctc gac gag ggc tac gtc cgg atc Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile 145 150 155 160	480		
10	aag ctg aag atc gag ccc ggc tgg gac gtc gag ccg gtc cgg cag gtg Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val 165 170 175	528		
15	cgt gag cgc ttc ggt gac gac gtg ctg ctg cag gtc gac gcg aac acc Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr 180 185 190	576		
20	gcg tac acg ctg ggc gac gcg ccc ctg ctg tcc cgg ctc gac ccg ttc Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe 195 200 205	624		
25	gac ctg ctg ctg atc gag cag ccg ctc gaa gaa gag gac gtg ctc ggc Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly 210 215 220	672		
30	cac gcc gag ctg gcc aag ccg atc ccg acg ccg atc tgc ctc gac gag His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu 225 230 235 240	720		
35	tcg atc gtc tgc gcc aag gcc gcc gcg gac gcg atc aag ctc ggc gcc Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala 245 250 255	768		
40	tgc cag atc gtc aac atc aaa ccg ggc ccg gtc ggc gga tac ctc gaa Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu 260 265 270	816		
45	gcc cgc ccg gtg cac gac gtc tgc gcg gca cac ggg atc gcg gtg tgg Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp 275 280 285	864		
50	tgc ggc ggg atg atc gag acc ggg ctc ggc ccg gcg gcc aac gtc gca Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala 290 295 300	912		
55	ctg gcc tcg ctg ccc ggc ttc acg ctg ccg ggg gac acc tcg gcg tcc Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser 305 310 315 320	960		
60	ggc ccg ttc tat cgc acc gac atc acc gag ccg ttc gtg ctg gac gcc Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala 325 330 335	1008		
65	ggg cat ctg ccg gtg ccg acc ggg ccg ggc ctc ggg gtg act ccg att Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile 340 345 350	1056		
70	ccg gat ctt ctg gac gag gtc acc acg gag aaa gcg tgg atc ggt tcg Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly Ser 355 360 365	1104		
75	Lag	1107		

<210> 2

<211> 369

<212> PRT

<213> Amycolatopsis orientalis

<400> 2

Val Lys Leu Ser Gly Val Glu Leu Arg Arg Val Arg Met Pro Leu Val
 1 5 10 15

Ala Pro Phe Arg Thr Ser Phe Gly Thr Gln Ser Glu Arg Glu Leu Leu
 20 25 30

Leu Val Arg Ala Val Thr Pro Ala Gly Glu Gly Trp Gly Glu Cys Val
 35 40 45

Ala Met Glu Ala Pro Leu Tyr Ser Ser Glu Tyr Asn Asp Ala Ala Glu
 50 55 60

His Val Leu Arg Asn His Leu Ile Pro Ala Leu Leu Ala Ala Glu Asp
 65 70 75 80

Val Thr Ala His Lys Val Thr Pro Leu Leu Ala Lys Phe Lys Gly His
 85 90 95

Arg Met Ala Lys Gly Ala Leu Glu Met Ala Val Leu Asp Ala Glu Leu
 100 105 110

Arg Ala His Asp Arg Ser Phe Ala Ala Glu Leu Gly Ser Thr Arg Asp
 115 120 125

Ser Val Ala Cys Gly Val Ser Val Gly Ile Met Asp Ser Ile Pro His
 130 135 140

Leu Leu Asp Val Val Gly Gly Tyr Leu Asp Glu Gly Tyr Val Arg Ile
 145 150 155 160

Lys Leu Lys Ile Glu Pro Gly Trp Asp Val Glu Pro Val Arg Gln Val
 165 170 175

Arg Glu Arg Phe Gly Asp Asp Val Leu Leu Gln Val Asp Ala Asn Thr
 180 185 190

Ala Tyr Thr Leu Gly Asp Ala Pro Leu Leu Ser Arg Leu Asp Pro Phe
 195 200 205

Asp Leu Leu Leu Ile Glu Gln Pro Leu Glu Glu Glu Asp Val Leu Gly
 210 215 220

His Ala Glu Leu Ala Lys Arg Ile Arg Thr Pro Ile Cys Leu Asp Glu
 225 230 235 240

Ser Ile Val Ser Ala Lys Ala Ala Ala Asp Ala Ile Lys Leu Gly Ala
 245 250 255

Cys Gln Ile Val Asn Ile Lys Pro Gly Arg Val Gly Gly Tyr Leu Glu
 260 265 270

Ala Arg Arg Val His Asp Val Cys Ala Ala His Gly Ile Ala Val Trp
 275 280 285

5 Cys Gly Gly Met Ile Glu Thr Gly Leu Gly Arg Ala Ala Asn Val Ala
 290 295 300

Leu Ala Ser Leu Pro Gly Phe Thr Leu Pro Gly Asp Thr Ser Ala Ser
 305 310 315 320

10 Gly Arg Phe Tyr Arg Thr Asp Ile Thr Glu Pro Phe Val Leu Asp Ala
 325 330 335

Gly His Leu Pro Val Pro Thr Gly Pro Gly Leu Gly Val Thr Pro Ile
 340 345 350

15 Pro Asp Leu Leu Asp Glu Val Thr Thr Glu Lys Ala Trp Ile Gly
 355 360 365

Ser

20

<210> 3
 <211> 504
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

25

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Gensonde

<400> 3
 atgaaactga gcggcggtgga actgcggcga gtccggatgc cgctcgtggc cccgttccgg 60

30 acgtcgttcg ggacgcagtc cgagcgggaa ttgctgctgg tccgcgcggt gaccccggcg 120

ggcgagggct ggggcgaatg tgcgcgatg gaggcgccgc tctactcgtc ggagtacaac 180

35 gacgcgcgcg agcacgtgct gcggaaccat ctgateccccg cactgctggc ggccgaggac 240

gtgaccgcgc acaaggtgac gccgttgctg gcgaagttca agggccaccg gatggcgaag 300

ggcgcgctgg agatggcggt cctcgacgcc gaactccgcg cgcattgaccg gtccttcgcg 360

40 gccgagctgg ggtccactcg cgactccgtg gcctgcgggg tctcggtcgg gatcatggac 420

tcatcccgcc acctgctcga cgtcgtcggc ggctacctcg acgagggcta cgtccgcata 480

aagctcaaga tcgaaccggg ctgg 504

45

<210> 4
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

50

<220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(30)

55

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer AR1

5

<400> 4

atgaaactga gcggcgtgga actgcggcga

30

<210> 5

10

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer AR5

20

<400> 5

cgcatcaagc tcaagatcga acccggtgg

30

<210> 6

25

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
AR_EX2Bgl

<400> 6

gaattcgtaa gatcttacga accgatccac g

31

35

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

40

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
AR_EX1Nde

45

<400> 7

caaggagcac atatgaaact cagcgggtgtg g

31

50

Patentansprüche1. N-Acetylaminosäureracemase aus *Amycolatopsis orientalis* subspecies *lurida*.

55

2. Gene codierend für die Racemase gemäß Anspruch 1.

3. Plasmid aufweisend die Gene nach Anspruch 2.

4. Vektor aufweisend die Gene nach Anspruch 2.

5. Mikroorganismus aufweisend die Gene nach Anspruch 2.

5 6. Primer für ein Gen nach Anspruch 2.

7. Sonde für ein Gen nach Anspruch 2.

10 8. Verwendung der Racemase nach Anspruch 1 in einem Prozeß zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren oder deren Derivaten.

15 9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man den Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor durchführt.

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1:

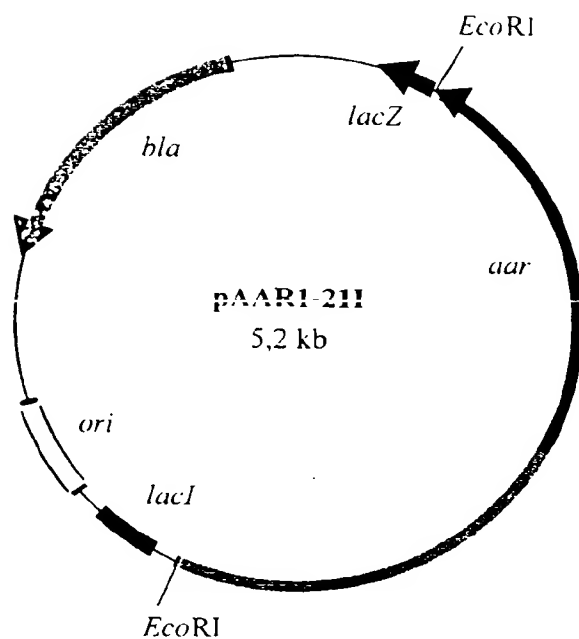


Fig. 2:

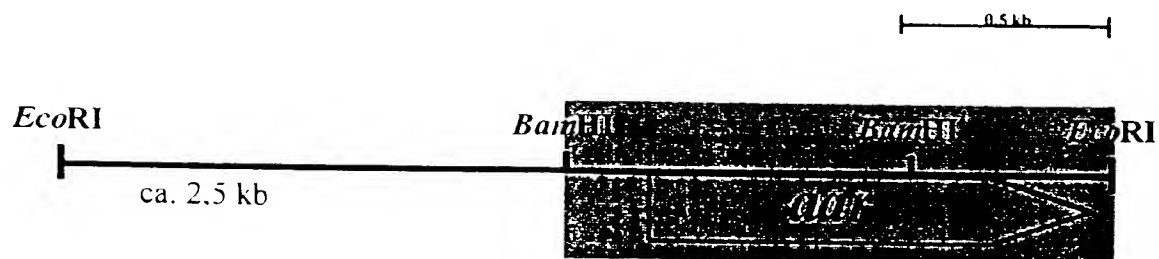


Fig. 3:

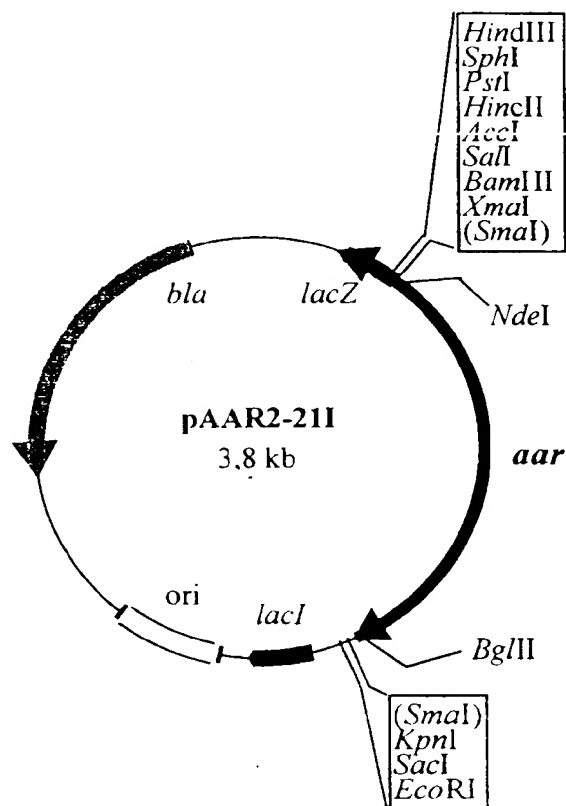


Fig. 4:

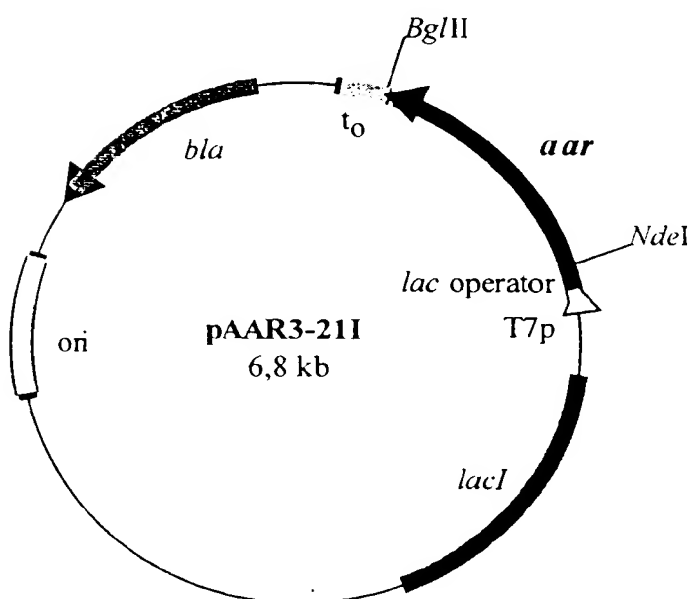


Fig. 5:

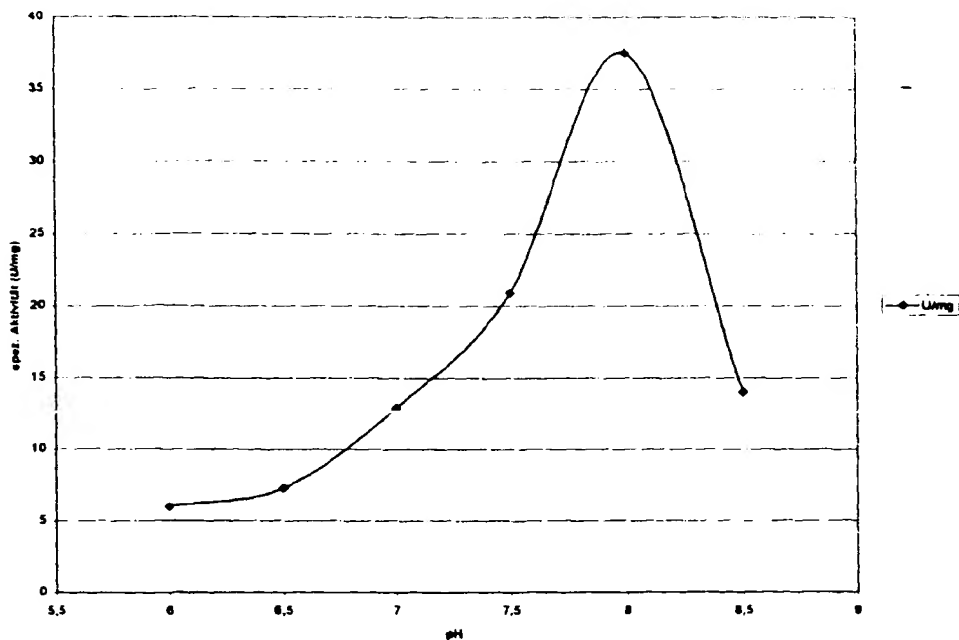


Fig. 6:

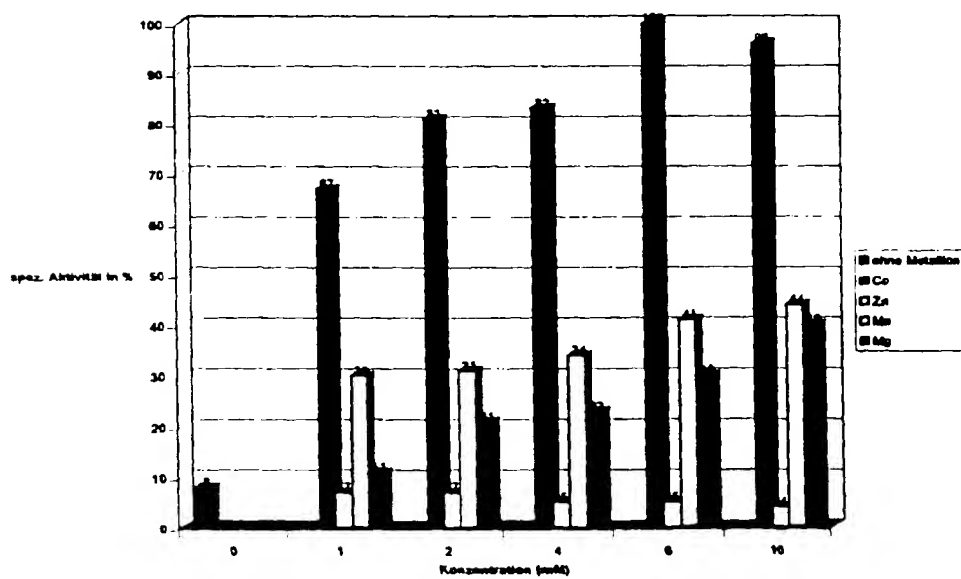


Fig. 7:

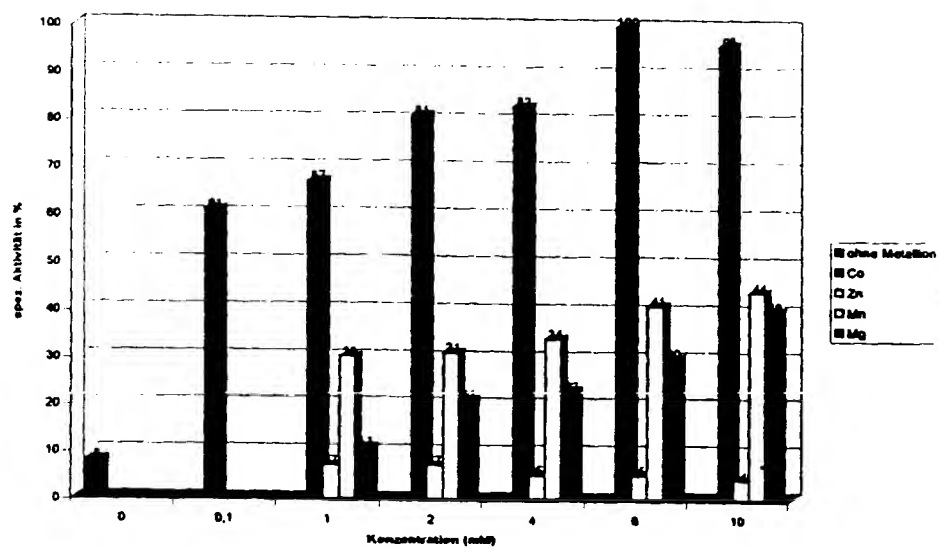
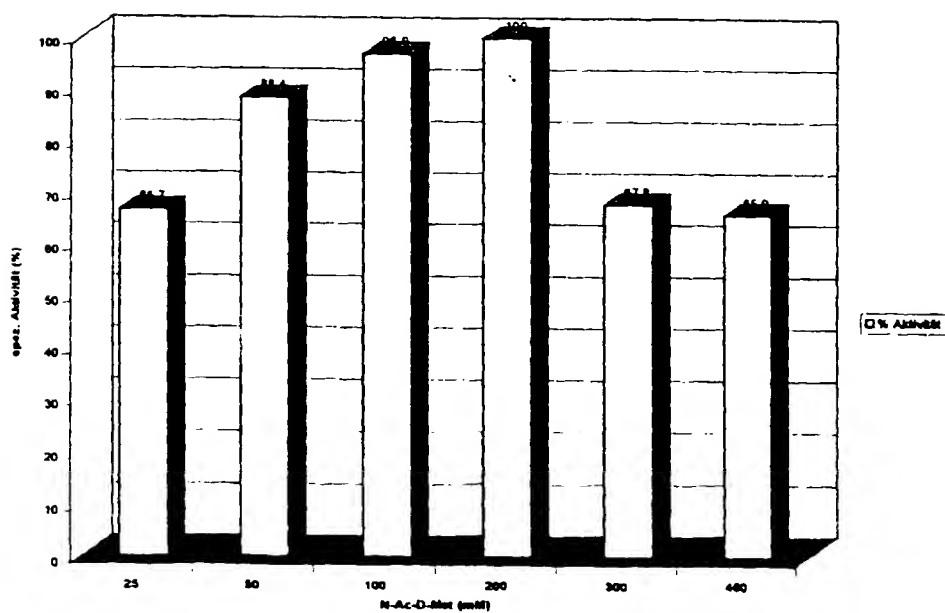


Fig. 8:





Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 00 11 5902

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	EP 0 474 965 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 18. März 1992 (1992-03-18) * das ganze Dokument *		C12N15/61 C12N15/80 C12N1/21 C12N9/90 C12Q1/68 C12P41/00 //(C12P41/00, C12R1:01)
A	DATABASE EMBL SEQUENCE DATABASE 'Online! Hinxton, UK; 4. Oktober 1995 (1995-10-04) S. TOKUYAMA: "Amycolatopsis sp. Aaar gene for A-acetyl amino acid racemase, complete cds." XP002154241 EMBL EMPR01:ASAAAR, Accession no. D30738 * Zusammenfassung *		
A	EP 0 304 021 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 22. Februar 1989 (1989-02-22) * das ganze Dokument *		
A	MARSHALL C G ET AL: "Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms." ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Bd. 42, Nr. 9, 1998, Seiten 2215-2220, XP002154240 ISSN: 0066-4804 * das ganze Dokument *		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
			C12P C12N C12Q
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	30. November 2000	Hornig, H	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 1503 03 82 (P) (AC03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 00 11 5902

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995 MEHLING ANNETTE ET AL: "Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: Towards a specific identification system for streptomycetes using PCR." Database accession no. PREV199598547032 XP002154242 * Zusammenfassung * & MICROBIOLOGY (READING), Bd. 141, Nr. 9, 1995, Seiten 2139-2147, ISSN: 1350-0872</p> <p>-----</p>		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 30. November 2000	Prüfer Hornig, H
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : schriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur</p> <p>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</p> <p>& Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			

EPO FORM 1503 03 92 (P04C03)

ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.

EP 00 11 5902

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

30-11-2000

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0474965 A	18-03-1992	CA 2038202 A	15-03-1992
		HU 59958 A	28-07-1992
		JP 6205668 A	26-07-1994
		JP 3066473 B	17-07-2000
		JP 4365482 A	17-12-1992
		US 5525501 A	11-06-1996
EP 0304021 A	22-02-1989	AT 88753 T	15-05-1993
		CN 1035320 A,B	06-09-1989
		DE 3880585 A	03-06-1993
		DE 3880585 T	12-08-1993
		DK 462488 A	22-02-1989
		HU 47317 A,B	28-02-1989
		JP 1137973 A	30-05-1989
		JP 2712331 B	10-02-1998
		KR 9700185 B	06-01-1997
		US 4981799 A	01-01-1991

EPO FORM P4481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82